



Universidade de Brasília

Instituto de Química

Curso de Química Tecnológica

EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA UTILIZANDO POLÍMERO DE IMPRESSÃO MOLECULAR PARA A DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA

LUANA SILVA SOUSA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Orientadora: Prof. Dr^a Ana Cristi Basile Dias

Co-orientadora: Fabiana Casarin

Brasília, dezembro de 2018

LUANA SILVA SOUSA

EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA UTILIZANDO POLÍMEROS DE IMPRESSÃO
MOLECULAR PARA A DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Instituto de Química –
IQ, da Universidade de Brasília – UnB,
como requisito parcial ao programa de
graduação em Química Tecnológica,
para obtenção do título de Bacharel em
Química Tecnológica.

EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA UTILIZANDO POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR PARA A DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA

Luana Silva Sousa

Professora orientadora: Dr.^a Ana Cristi Basile Dias

Co-orientadora: Fabiana Casarin

Professora: Dr.^a Andressa R. Vasques Mendonça

Professora: Dr.^a Lilian Rodrigues Braga

Brasília, Dezembro de 2018

Agradecimentos

Primeiramente quero agradecer aqueles que me ajudaram a fazer esse trabalho, em especial à professora Ana Cristi, desde a iniciação científica até hoje. Agradeço muito pelas orientações e sua disponibilidade, com certeza foram de grande enriquecimento e ajuda, pela paciência e a vontade de me auxiliar em todos os momentos. Agradeço também a Fabiana, por ter sido incrível comigo do começo ao fim, pelas orientações, companheirismo e pela confiança que passa. Levo comigo o carinho que tenho por você por sempre ter me ajudado e também a paciência em me orientar. Sem você a minha pesquisa não seria a mesma!

Agradeço também a todos do grupo LIAMA/AQQUA, em especial à Camila, pelas dúvidas esclarecidas e ao professor Alexandre, que sempre propiciou um bom convívio no laboratório. Agradeço ao LDPQ-IQ pela disponibilidade com o HPLC.

Agradeço aos meus pais e ao meu irmão por todo o apoio dado, desde o dia que decidi entrar na UnB até hoje. Espero poder retribuir todo o apoio que deram a mim, por terem me ajudado em todo esse tempo.

Aos meus amigos que criei nessa Universidade, em especial a Isabela, desde o primeiro dia de aula. À Jessica, pela amizade, pela ajuda com as matérias e pelos tantos desabafos e papos que tive com vocês. Agradeço de coração tudo que a nossa amizade significa. Agradeço também ao Jorge, Dani, Clécia. Todos vocês foram importantes nessa jornada.

Uma menção especial ao meu garoto, que sempre me ouviu, sempre me deu suporte e é um companheiro sem igual. Por todo apoio que você me deu nesse período, por ouvir meus choros de desesperos e desabafos, pelo cuidado e carinho que você tem comigo, agradecer é pouco pelo o que você faz por mim. Obrigado por ser incrível.

Aos meus amigos de infância, do Riacho, que estão comigo até hoje. Vocês também fazem parte dessa jornada.

A todos os professores dessa Universidade que me ajudaram a chegar aqui.

Agradecimentos à FAPDF pelo apoio financeiro, e ao IQ-UnB pela disponibilidade do espaço.

Resumo

Esse trabalho teve o objetivo de sintetizar um polímero de impressão molecular para adsorção seletiva de cafeína em água, utilizando a técnica de extração em fase sólida com determinação por espectrofotometria UV-VIS e HPLC. Utilizando a rota sol-gel para a sua síntese, o material foi avaliado quanto no aspecto morfológico (MEV) e estrutural (FT-IR, TGA, ensaios de porosimetria BET e BJH), além da capacidade de adsorção (Q) ter sido avaliada por ensaios cinéticos e estáticos em comparação ao polímero controle. Os resultados indicaram um material com características mesoporosas, boa resistência térmica e com diferenças morfológicas se comparado ao polímero controle. A capacidade adsortiva máxima foi de $0,91 \text{ mg.g}^{-1}$ enquanto o polímero controle foi de $0,08 \text{ mg.g}^{-1}$, obtendo um fator de impressão FI igual a 11,3. Para os estudos de extração em fase sólida, foram avaliados o pH da amostra e do solvente de eluição, o volume *Breakthrough*, eficiência de extração de diferentes solventes, reutilizações e o custo de síntese da fase sólida, afim de se comparar com a fase sólida comercial. Os resultados mostraram que o cartucho contendo a fase sólida sintetizada foi eficiente em reter o analito de interesse, assim como o metanol se apresentou como um ótimo solvente de eluição utilizando pouco volume para tal finalidade. Além disso, identificou-se que o cartucho MISPE pôde ser reutilizado 24 vezes pelos parâmetros estabelecidos. Por fim, o custo final da fase sólida foi de R\$ 0,50 centavos, considerando todas as reutilizações e quantos cartuchos podem ser construídos a partir de uma síntese. O preço da fase sólida comercial ficou em torno de R\$ 17,00, considerando que o material é de uso único.

Abstract

The objective of this work was to synthesize a molecular imprinting polymer for the selective adsorption of caffeine in water using the solid phase extraction technique with UV-VIS spectrophotometry and HPLC. Using the sol-gel route for its synthesis, the material was evaluated in the morphological (MEV) and structural (FT-IR, TGA, BET and BJH porosimetry tests), besides the adsorption capacity (Q) was evaluated by kinetic and static assays compared to the control polymer. The results indicated a material with mesoporous characteristics, good thermal resistance and with morphological differences when compared to the control polymer. The maximum adsorptive capacity was 0.91 mg.g^{-1} while the control polymer was 0.08 mg.g^{-1} , obtaining a FI printing factor of 11.3. For the solid phase extraction studies, the pH of the sample and elution solvent, Breakthrough volume, extraction efficiency of different solvents, reuses and the cost of solid phase synthesis were evaluated in order to compare with the solid phase commercial. The results showed that the cartridge containing the solid phase synthesized was efficient in retaining the analyte of interest, as well as the methanol presented as a good elution solvent using little volume for such purpose. In addition, it was identified that the MISPE cartridge could be reused 24 times by the established parameters. Finally, the final cost of the solid phase was R\$ 0.50 cents, considering all the reuses and how many cartridges can be constructed from a synthesis. The price of the commercial solid phase was around R\$ 17.00, considering that the material is for single use.

Lista de Abreviações

ALC: agente de ligação cruzada, tetraetilortossilicato

APTMS: (3-aminopropil) trimetoxissilano, monômero funcional

BET: técnica Brunauer, Emmett, Teller.

BJH: técnica Barret, Joyner e Halenda

C2: fase sólida dimetil

C8: fase sólida octil

C18: fase sólida octadecil

FT-IR: Infravermelho com Transformada de Fourier

HCl: ácido clorídrico

HPLC: cromatografia de alta eficiência

LLE: extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*)

MeOH: metanol

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MF: monômero funcional, (3-aminopropil) trimetoxissilano

MIP: polímero impresso molecularmente

MISPE: extração em fase sólida de polímero impresso molecularmente

MM: molécula molde, cafeína

NH₄OH: hidróxido de amônio

NIP: polímero não impresso, polímero controle

Q: capacidade adsortiva do material, em mg/g

RPM: rotações por minuto

SPE: extração em fase sólida

TEOS: tetraetilortossilicato, agente de ligação cruzada

Lista de Figuras

Figura 1: Etapas típicas do SPE. Em (1) temos o condicionamento do sorvente e ativação do material; em (2) a inserção da amostra e percolação na fase sólida; em (3) etapa de lavagem dos interferentes e em (4) eluição do analito. Adaptado de Amparo (2013).	14
Figura 2: Esquema de obtenção de um MIP. Adaptado de Leitão (2014).....	17
Figura 3: Esquema de síntese sol-gel híbrido do MIP de cafeína. Adaptado de Silva(2009)	23
Figura 4: Instrumentação utilizada. Em (1) temos o suporte para o cartucho de SPE, em (2) temos a bomba peristáltica e em (3) temos a coleta do eluato que será analisado em HPLC ou em UV-VIS.....	27
Figura 5: Espectro de absorção no infravermelho (FT-IR) em pastilha de KBr do MIP e NIP.	29
Figura 6: Imagens de microscopia eletrônica de varredura para o MIP e NIP. Em (A), (B), (C) são imagens obtidas pelo NIP, e (D), (E) e (F) são imagens do MIP. As Imagens tiveram um aumento de 2000, 5000 e 10000 vezes respectivamente....	30
Figura 7: Gráfico termogravimétrico para o MIP e NIP.....	31
Figura 8: Gráfico sobre o estudo cinético para o MIP e NIP. Observa-se que a capacidade adsorptiva se mantém constante ao alcançar o tempo de 120 minutos...	32
Figura 9: Isoterma de adsorção para o MIP e NIP. O MIP obteve um Q de 0,91 mg.g ⁻¹ , enquanto o NIP obteve um Q de 0,08 mg.g ⁻¹ , nos tempos de 10 minutos até 240 minutos.....	33
Figura 10: Gráfico de Pareto com os parâmetros escolhidos para a etapa de eluição.	34
Figura 11: Curva de calibração da cafeína nas concentrações de 0,1mg.L ⁻¹ a 10 mg.L ⁻¹ obtidas por HPLC.....	35

Lista de Tabelas

Tabela 1: Parâmetros utilizados para os estudos de eluição utilizando o planejamento experimental do tipo 2 ³	26
Tabela 2: Magnitudes codificadas utilizadas para os estudos de eluição com o planejamento experimental do tipo 2 ³	26
Tabela 3: Porosimetria dos MIPs/NIPs sol-gel híbridos	31
Tabela 4: Valores obtidos de extração da cafeína para o metanol e acetonitrila.....	36
Tabela 5: Dados obtidos para a reutilização do cartucho.	37
Tabela 6: Preços dos materiais utilizados com o valor total e posteriormente considerando as reutilizações e rendimento da síntese.....	38

Sumário

1. Revisão bibliográfica	12
1.1. Preparo de amostras	12
1.3. Extração em fase sólida	13
1.4. Polímeros impressos molecularmente	16
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivos gerais	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. METODOLOGIA	21
3.1. Materiais e equipamentos	21
3.2. Síntese e preparação do polímero impresso molecularmente (MIP/NIP)	22
3.3. Caracterização morfológica e estrutural do MIP e NIP	23
3.4. Estudos de adsorção cinética e estática	24
3.5. Estudos de otimização da fase sólida MISPE	25
3.5.1. Estudo de solventes de eluição por planejamento fatorial 2 ³	25
3.5.2. Estudo de comparação entre solventes de eluição	27
3.5.3. Estudo de pH da amostra	28
3.5.4. Estudo do volume <i>Breakthrough</i>	28
3.5.5. Estudo de reutilização	28
3.5.6. Análise de custos	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. Caracterização morfológica e estrutural do MIP e NIP	29
4.2. Estudo de cinética e equilíbrio de adsorção	32
4.3. Estudos de otimização da fase sólida MISPE	33
4.3.1. Estudo de pH	33

4.3.2. Estudo de comparação entre solventes de eluição.....	35
4.3.3. Estudo do volume Breakthrough.....	35
4.3.4. Estudo de reutilização.....	36
4.3.5. Análise de custos.....	37
5. CONCLUSÃO.....	39
6. REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

1.1. Preparo de amostras

O preparo de amostras atualmente é uma etapa crucial para as análises químicas. Seja para auxiliar na detecção de elementos traços, na identificação de substâncias presentes em diferentes matrizes complexas, ou para os estudos de propriedades e quantificação de um analito. Essas diferentes necessidades exigem um avanço de tecnologia para tornar as análises cada vez mais eficientes, com rapidez, de maior sensibilidade e precisão. Dessa forma, o preparo de amostras também acompanha essa evolução (Jardim, 2010).

Devido a maioria dos instrumentos analíticos não poderem analisar a amostra diretamente, seja por conta da sua complexidade, pela presença de componentes que possam afetar na detecção direta, ou até mesmo de substâncias que possam afetar a vida útil do equipamento de análise, o preparo de amostras entra com o objetivo de realizar a extração, o isolamento ou eliminação de interferentes, a fim de minimizar posteriores problemas no momento da análise (Borges, Pereira e Mano, 2015).

O preparo de amostras geralmente é a etapa mais crítica no processo de análise, que demanda mais tempo, e é uma das principais fontes de erros. Dessa forma, o método para essa etapa deve ser o mais simples possível, rápido, seletivo, de baixo custo, e de uso mínimo de solventes no processo (Jardim, 2010; Laaks *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013).

Alguns métodos clássicos já disseminados são largamente usados em laboratórios e indústrias de diversos ramos. Dentre esses métodos, podemos citar a extração líquido-líquido (do inglês *liquid-liquid extraction*, ou LLE), que possui baixo custo, simplicidade e com uma gama de solventes que podem ser usados na extração. Entretanto, há um consumo considerável de solventes na extração e ainda pode ocorrer a formação de emulsão, que eleva o tempo do processo (Queiroz, Collins, & Jardim, 2001).

Um dos métodos mais utilizados para o preparo de amostra é a Extração em Fase Sólida (do inglês *Solid-phase extraction*, ou SPE), que se apresenta como uma alternativa para o auxílio de detecção de elementos a nível traço bem como na

remoção de interferentes na matriz. Com uso menor de solventes na extração, uma maior velocidade de operação e uma possibilidade de maior automatização, essa técnica ganha cada vez mais espaço em análises de matrizes complexas, como amostras de alimentos, fluidos biológicos e ambientais.

1.2. Extração em fase sólida

Com origem em estudos que remetem ao final dos anos 1970, a SPE caracteriza-se por ser uma operação de transferência de massa líquido-sólido, baseada na capacidade de um sólido em adsorver algumas substâncias na sua superfície (Silva, 2009). Desenvolvida para atender principalmente como pré coluna cromatográfica, por muito tempo se fixou como uma parte auxiliar e não crucial do processo de preparo de amostras. A sua virada se deu alguns anos depois, quando introduziu-se novos formatos e sínteses de novos materiais como fases sólidas devido a crescente demanda surgida de analitos solúveis em água que ao serem extraídos pela LLE não conseguiam bons índices de recuperação com os solventes orgânicos (Hennion, 1999).

Os mecanismos que envolvem o processo da SPE se baseiam na passagem de um líquido/matriz que contém o componente de interesse pela coluna (cartucho), que é composta por partículas sólidas capazes de adsorverem ou permitirem a passagem de um analito de interesse. O sorvente (fase sólida) deve possuir características compatíveis de interação com o analito de interesse, o suficiente para que seja maior que a do analito com a matriz (Jardim, 2010). A ideia de que o analito interaja com o sorvente permite que o mesmo seja retido no material e que possa posteriormente ser recuperado (Amparo, 2013).

Os principais mecanismos de separação envolvidos no processo são os de adsorção, partição, exclusão e de troca iônica (Rossi *et al.*, 2004). Os mecanismos mais utilizados são os de adsorção e partição. Segundo Oliveira (1999) o mecanismo de adsorção baseia-se na diferença de polaridade entre a fase móvel e a fase sólida, com o aumento da concentração do analito na interface das duas fases. Enquanto o de partição entra na questão de diferença de solubilidade de um componente entre as duas fases (Collins *et al.*, 1997).

A instrumentação da SPE é comumente composta por um cartucho de polipropileno em formato de seringa recheado com a fase sólida (sorvente), dois discos de polietileno são usados para evitar a passagem de partículas e uso de uma bomba peristáltica. No mercado existem diversos sorventes, que podem ser constituídos de orgânicos ligados a sílica, carbono e de materiais poliméricos. De um modo geral, os orgânicos ligados a sílica são os mais utilizados, com grupos aminopropil, cicloexil, fenil, C18, C8 e C2. Além disso, são os mais disponíveis no mercado para diferentes componentes de interesse (Jardim, 2010). As etapas características do SPE são comumente divididas em quatro partes, onde temos o condicionamento, inserção da amostra, lavagem (*clean-up*) e eluição, como é observado na Figura 1.

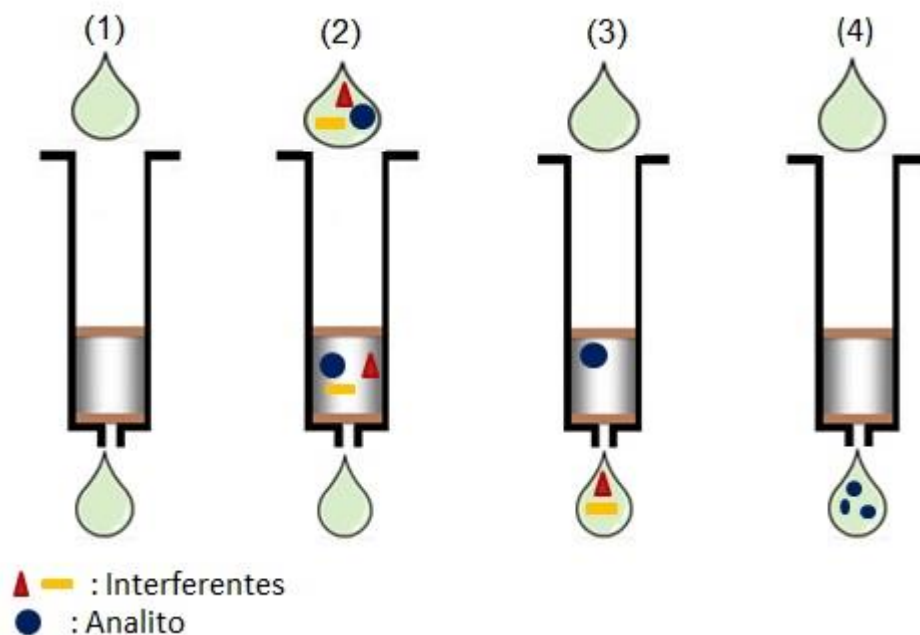


Figura 1: Etapas típicas do SPE. Em (1) temos o condicionamento do sorvente e ativação do material; em (2) a inserção da amostra e percolação na fase sólida; em (3) etapa de lavagem dos interferentes e em (4) eluição do analito. Adaptado de Amparo (2013).

Como é demonstrado na Figura 1 as etapas clássicas do SPE, o procedimento deve levar em consideração alguns parâmetros, considerando as características da matriz, a presença de interferentes e as propriedades físico-químicas do analito. Referente às etapas, o condicionamento visa que o material sorvente adquira características que permitam a sua interação com o analito de interesse, passando um solvente que tenha similaridades com o solvente em que a

amostra se encontra. Além disso, é uma etapa que permite a remoção de possíveis impurezas que se encontram no cartucho (Dourado, 2016).

Na etapa de inserção da amostra, aplica-se uma vazão mais lenta (geralmente menor que 2 mL/min) para a percolação ocorrer. Na etapa de lavagem (*clean-up*) o solvente de lavagem deve retirar apenas os interferentes e componentes que não interagiram com o material. Usualmente é o mesmo solvente em que a amostra se encontra. Por fim temos a etapa de eluição, onde se usa pequenos volumes do solvente para que apenas o analito seja removido. De um modo geral é usado um solvente mais forte do que aquele usado na etapa anterior, e deve ser compatível com o método analítico escolhido (Jardim, 2010; Bueno, 2012). A SPE possui muitas vantagens, como utilizar materiais resistentes a condições químicas abrasivas, além de possibilitar a detecção de analito na faixa de µg/kg a ng/kg por enriquecimento (Marestoni *et al.*, 2013). Entretanto, a técnica possui problemas referentes ao tempo relativamente longo do preparo, o custo dos cartuchos, serem de uso único e possuir problemas com a reprodutibilidade (Jardim, 2010).

Há uma busca por materiais que melhorem a seletividade e diminua a quantidade de etapas envolvidas, bem como reduzir os interferentes da matriz para obter uma maior seletividade. Uma estratégia que atualmente é objeto de estudo se baseia no reconhecimento molecular por interações seletivas. Conhecido como polímero impresso molecularmente, MIP (do inglês *molecularly imprinted polymer*), este material já possui aplicações na determinação de herbicidas como a atrazina (Grassi, 2008), de drogas ilícitas como a cocaína (Trindade, 2012), e de estrona em corpos d'água (Soares, 2015).

Devido a algumas características promissoras do MIP, o material vem sendo utilizado como fase sólida em conjunto com a SPE, originando a extração em fase sólida baseada em impressão molecular (do inglês *molecular imprint based solid-phase extraction*, ou simplesmente MISPE).

1.3. Polímeros Impressos molecularmente

A concepção de reconhecimento molecular surgiu de Linus Pauling, a partir da teoria de formação dos anticorpos (Pauling, 1940). Baseado na presença do antígeno como molde na síntese do anticorpo, a teoria se estabelece na especificidade do anticorpo por formar estruturas complementares com as regiões do antígeno através de ligações químicas (Vaz, 2009). Descrita como um fenômeno onde uma ligação de uma molécula a um receptor é preferencial diante de outras moléculas, o reconhecimento molecular em MIPs nos últimos anos é objeto de estudo em diversas vertentes, como em química ambiental, farmacêutica e em alimentos (Andersson *et al.*, 1984).

Os MIP são materiais sintéticos que possuem sítios seletivos de reconhecimento molecular moldados a partir do analito denominado de molécula molde (Soares, 2015). O MIP é sintetizado em uma reação de polimerização pela presença de molécula molde (MM), geralmente o analito ou análogo, que irá complexar com um monômero funcional (MF), e um agente de ligação cruzada (ALC). Em muitos casos, há a presença de um solvente que atua como porogênico. O solvente pode influenciar diretamente na força de ligação e também na morfologia do polímero sintetizado (Cheong *et al.*, 2013).

Quando se retira a MM do polímero, formam-se cavidades no formato e tamanho da molécula molde. Com os sítios vazios, a molécula de interesse pode se ligar seletivamente (Fernandes, 2012). O ALC é responsável pela obtenção da estrutura tridimensional, estabilização e rigidez do material entre a MM e MF, como podemos observar na Figura 2.

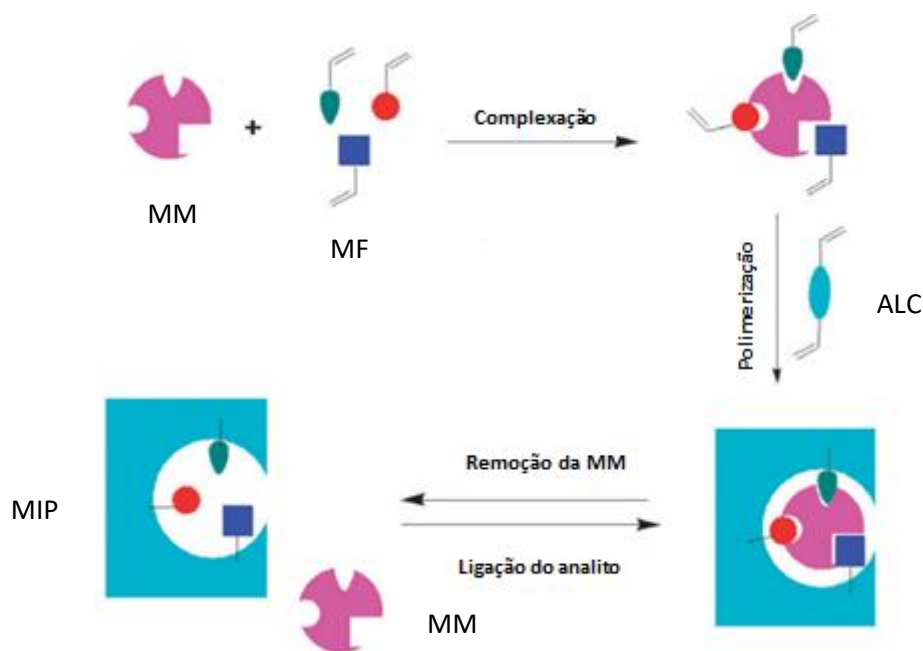


Figura 2: Esquema de obtenção de um MIP. Adaptado de Leitão (2014).

A natureza do MIP e suas propriedades de ligação vão além da composição da mistura de reação, mas do tipo e quantidade dos reagentes, temperatura de reação e o tipo de mecanismo de síntese (Baggiani *et al.*, 2012). Para uma determinada MM deve-se considerar os grupos funcionais do MF a ser utilizado, para obter uma ligação MM-MF suficientemente forte para a formação dos sítios de ligação, entretanto o suficientemente fraca para realizar a retirada da MM sem prejuízos às cavidades de reconhecimento molecular posteriormente formadas (Figueiredo *et al.*, 2008).

A formação de cavidades específicas poderá ocorrer por meio de ligações covalentes, não covalentes e semi covalentes. A impressão covalente possui maior estabilidade e favorece a formação de sítios de reconhecimento homogêneos, diminuindo a quantidade de sítios de ligação não específicos. Entretanto, o processo de remoção da MM torna-se difícil, demandando condições drásticas para a sua retirada (Shea e Thompson, 1978).

A impressão não covalente permite interações da MM-MF por meio de ligações de hidrogênio, Van der Waals, dipolo-dipolo e dipolo induzido, que são tipicamente mais fracas. Essa impressão facilita a retirada da molécula molde,

entretanto, tal impressão é baseada no equilíbrio químico entre MM-MF, e para a impressão ocorrer de forma eficiente precisa-se de excesso de MF, que ao ser incorporado na mistura reacional, ficará inserido na matriz, gerando sítios de ligações inespecíficos (Tamayo *et al.*, 2007). Atualmente é o processo de síntese mais utilizado, devido a facilidade de se retirar a MM.

A impressão semi-covalente é uma mistura entre as duas, onde a ligação MM-MF é por meio de ligação covalente e a religação é feita por ligações não covalentes. O MIP possui de um modo geral boas características, como resistência física e mecânica, além de suportar altas pressões e temperaturas. Normalmente é inerte e resiste a mudanças de pH do meio, possui longo tempo de vida de uso e a sua síntese é relativamente simples (Cheong *et al.*, 2013; Fumes *et al.*, 2015).

Uma das sínteses mais utilizadas para a obtenção de MIP é a sol-gel, caracterizada pela formação de uma rede tridimensional inorgânica que resulta na transição de uma solução coloidal (sol) para a gelificação (gel). A síntese sol-gel permite uma variação em quais MF, ALC poderão ser usados. Dessa forma, essa síntese pode produzir MIP orgânico, inorgânico ou híbrido. A síntese orgânica produz materiais flexíveis, entretanto com baixa resistência ao meio, enquanto a síntese inorgânica produz materiais com resistência química e física, a ao unir as boas características de ambos, obtemos a síntese híbrida (Silva, 2009).

A síntese realizada nesse trabalho envolve a produção de um polímero híbrido, ou seja, que possua na sua síntese compostos orgânicos e inorgânicos. Utilizou-se como rota de síntese o processo sol-gel, que se torna muito vantajoso para esse tipo de síntese, que reúne as qualidades dos materiais inorgânicos e orgânicos, como alta estabilidade térmica e química ao material, alto controle de porosidade, tamanho e forma da partícula. Além disso, é uma síntese de baixa complexidade, realizada sob temperaturas mais brandas, obtendo-se ainda um material de alta pureza (Silva, 2009; Hiratsuka *et al.*, 1995)

O material sintetizado teve como MM a cafeína, pelo fato de ser um composto amplamente consumido pelo ser humano, através de fármacos, bebidas e alimentos. A cafeína é encontrada em águas superficiais devido à ineficiência do tratamento de esgoto ou pelo seu descarte incorreto. É considerado um indicador de contaminação

antrópica, e não existe uma legislação específica para tratamento desse indicador nem limites máximos permitidos para a sua presença (Canela, Jardim, Sodré, & Grassi, 2014). Dessa forma, a cafeína foi a molécula selecionada por abrir possibilidade de estudos posteriores em matrizes aquosas complexas.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Sintetizar um polímero impresso molecularmente como fase sólida seletiva para a cafeína e comparar em relação ao polímero controle, através de estudos que caracterizem o material.

2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar os polímeros de impressão molecular através da técnica de polimerização sol-gel, utilizando cafeína como molécula molde;
- Caracterizar o material quanto a estrutura, morfologia e porosidade;
- Estudar a eficiência de extração do polímero com a molécula de cafeína em relação ao polímero controle, NIP;
- Realizar estudos de recuperação e reutilização do cartucho de SPE contendo o MIP de cafeína frente ao cartucho de SPE comercial;
- Realizar estudo de custos do MIP para a realização do procedimento em comparação com a fase sólida comercial.

3. Metodologia

3.1. Materiais e equipamentos

Reagentes utilizados: Aminopropiltrimetoxissilano (APTMS) 97%, da Sigma-Aldrich; Tetraetoxissilano (TEOS), Sigma-Aldrich; Cafeína grau P.A. Sigma-Aldrich; metanol 99,8%, da Biograde; ácido clorídrico (HCl), Biograde; hidróxido de amônia (NH₄OH), Biograde. A água utilizada neste estudo foi deionizada ($\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) produzida utilizando um sistema de purificação Milli-Q.

Equipamentos:

- Balança analítica, Shimadzu, precisão de 0,0001 g
- Banho ultrassom Unique, modelo 1400
- Espectrofotômetro UV-Vis, Agilent, modelo 8454.
- Homogeneizador Hematológico modelo SP 260H SP Labor
- Bomba peristáltica, Ismatec, modelo IPC High precision multichannel dispenser
- Agitador magnético com aquecimento Go-Stirrer MS-H-S
- Centrífuga, de bancada KC5, Kinddly, velocidade máxima 4.000 rpm
- Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), Modelo FEI Quanta 200-3D,
- Análise termogravimétrica – Shimadzu, Modelo: DTG-60H
- Bomba a vácuo
- Kitassato e funil de Buchner
- Estufa
- Cartuchos de SPE comerciais usadas - Oasys
- HPLC - Shimadzu, composto de uma bomba de alta pressão, modelo LC-20AD; Detector Flexar PDA, válvula de injeção (alça de amostragem de 20 μL); Software Chromera, verison 3.4.0.5712, PerkinElmer.
- Coluna cromatográfica Bownlee Analytical C18 diâmetro médio de 5 μm , 250 x 4,6 mm, PerkinElmer
- Surface Area e Pore Size Analyser, Quantachrome, modelo Nova 2200 c.

- Espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), Varian, Modelo 640-IR
- Sistema de deionização de água MILI-Q
- Holder para filtração
- Membrana de filtração, 0,22 μm Sigma-Aldrich.
- Membrana de celulose, 0,45 μm Sigma-Aldrich.

3.2. Síntese e preparação do polímero impresso molecularmente (MIP/NIP)

Com o esquema observado na Figura 3, a síntese sol-gel híbrida foi realizada em um bquer disposto em uma chapa aquecedora (temperatura em até 45°C) com agitação constante, e consistiu na mistura respectiva de 10 mL de água destilada, 4 mmol de cafeína, 2 mmol de APTMS, 200 μL de hidróxido de amônio. Após alguns minutos de agitação, foram adicionados 8 mmol de TEOS (Casarin, 2018). Quando verificou a formação do gel, o procedimento na chapa aquecedora e agitação foi cessado, e deixou-se a polimerização ocorrer por 72 horas a temperatura ambiente. Após o tempo de descanso, o material foi colocado em estufa a 120 °C por 2 horas para secagem do material. O produto foi então macerado e peneirado, para a separação de partículas entre 125 μm e 56 μm .

Para a remoção da MM, o material foi lavado exaustivamente com metanol sob agitação constante e aquecimento a 45° C, na proporção de 1g do produto por 40 mL de metanol. Para verificar se a remoção da cafeína estava eficiente, foi utilizado um espectrofotômetro UV-VIS em 272 nm para a identificação de cafeína no solvente extrator. Por sim, o produto foi colocado em estufa a 120 °C para secagem e estocado em frascos de vidro até a sua utilização. Em paralelo, foi sintetizado o polímero não impresso (NIP), nas mesmas condições reacionais, sem a presença da cafeína.

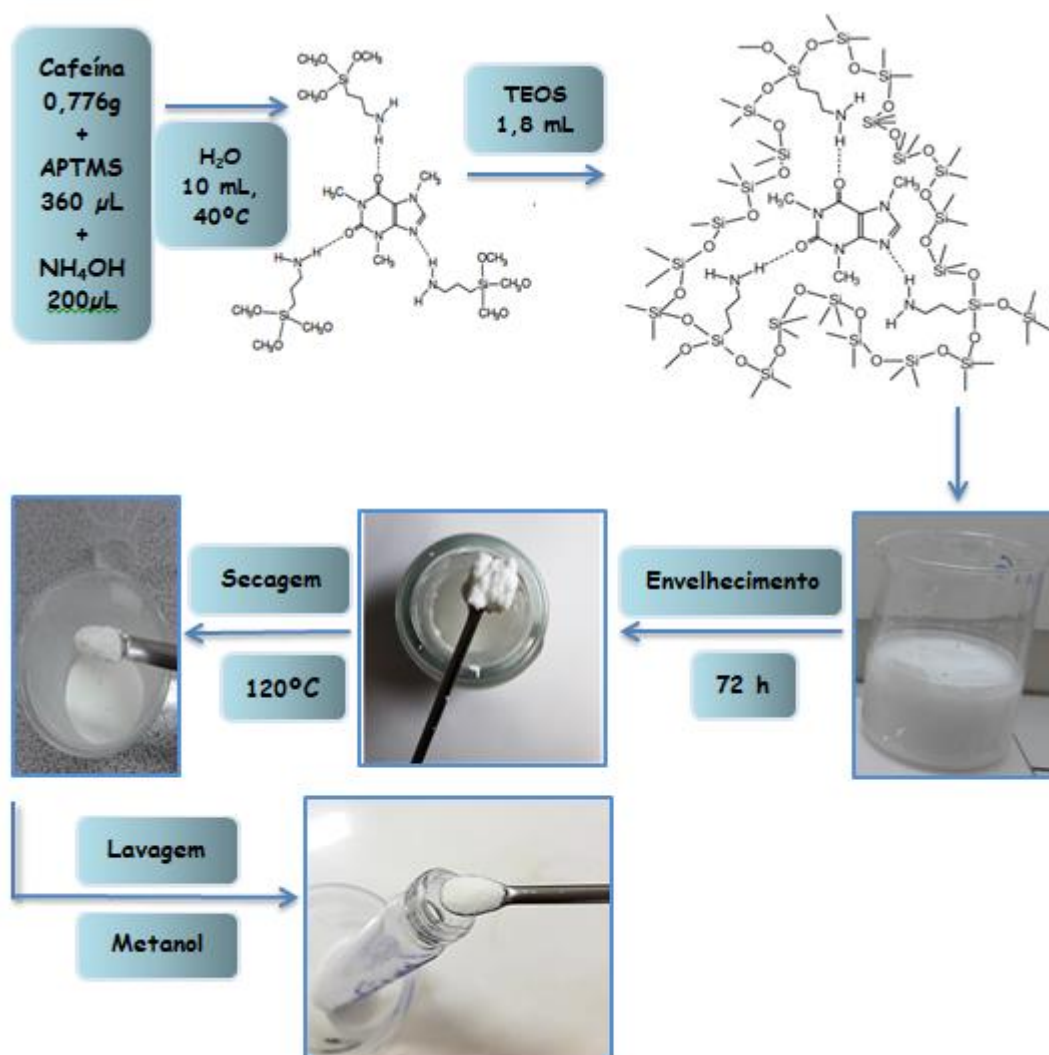


Figura 3: Esquema de síntese sol-gel híbrido do MIP de cafeína. Adaptado de Silva (2009).

3.3. Caracterização morfológica e estrutural do MIP e NIP

Para avaliar os grupos funcionais existentes e as interações, foi usado o espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho. Os polímeros foram macerados em KBr a temperatura ambiente. Os ensaios foram conduzidos num espectrômetro de infravermelho, com transformada de Fourier (FT-IR), Modelo 640-IR (Varian), com resolução de 4 cm⁻¹ e medidas entre 400 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹ e 64 varreduras. O equipamento é pertencente ao Laboratório da central analítica do IQ-UnB.

Para a caracterização morfológica da superfície dos MIP/NIP foi realizada num Microscópio Eletrônico de Varredura (Modelo FEI Quanta 200-3D), que

pertence ao Instituto Nacional de Criminalística de Brasília. Cada amostra foi previamente metalizada com ouro, para torna-la condutora, utilizando atmosfera inerte de Argônio, enquanto as superfícies foram registradas com ampliações de 500 a 10000x.

A porosidade e a área superficial específica dos polímeros foram avaliadas através de ensaios de adsorção e dessorção de N₂ que consistiu na exposição do polímero a 100 °C, por 3 horas a vácuo. Em seguida foi submetido a diferentes pressões de nitrogênio e em seguida, a adsorção física e dessorção de gás nitrogênio, e feita medição em função da sua pressão.

Também foram obtidas as isotermas de sorção, pelos métodos BET (Brunauer, Emmett and Teller) e o BJH (Barret, Joyner and Halenda), para verificar tanto a área superficial quanto a do volume e do tamanho dos poros. O ensaio foi conduzido em um equipamento Surface Area e Pore Size Analyser, a 100 °C, pertencente ao Laboratório de Materiais e Combustíveis (LMC) do IQ-UnB.

As análises termogravimétricas do MIP e NIP foram realizadas para avaliar as estabilidades térmicas dos materiais. O experimento foi conduzido no equipamento 2960 Simultaneous DSC-TGA da TA, e através de uma micro-balança, foi possível determinar a porcentagem de perda da massa da amostra com relação ao aumento da temperatura. Foram aquecidos de 25 °C até 1000 °C a 10 °C/min, em ar sintético. O equipamento é pertencente ao Laboratório da central analítica do IQ-UnB.

3.4. Estudos de adsorção cinética e estática

Para avaliar o tempo necessário para alcançar o equilíbrio (cinética) da interação do MIP/NIP com a cafeína, utilizou-se 36 tubos Falcon de 15 mL, cada tubo contendo 20 mg de MIP ou NIP, e foi adicionado 10 mL de uma solução de cafeína em água destilada 2 mg L⁻¹. Nessa etapa, também foram feitos os “brancos” para cada tempo selecionado. Os tubos foram mantidos por agitação constante a temperatura ambiente e a cada tempo determinado (10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 e 240 min) foram retirados 3 tubos da cada vez (um de MIP, NIP, e um branco) até completar o período de 240 minutos. Removidos os frascos, realizou-se a centrifugação dos mesmos por 20 min a 4000 rpm e o sobrenadante então foi

filtrado. Com auxílio do espectrofotômetro UV-VIS, foi analisado a remanescente de cafeína que não foi adsorvida pelo material no tempo estimado no comprimento de onda 272 nm. Além disso, foi construída uma curva de calibração no UV-VIS com soluções padrão de cafeína, entre 0,5 mg.L⁻¹ a 20 mg.L⁻¹.

Para analisar a capacidade de reconhecimento molecular do MIP e NIP foram realizados estudos de adsorção estática com soluções de cafeína em água destilada. Acrescentou-se 40 mg de MIP em tubos Falcon de 15 mL, adicionando 10 mL de solução de cafeína em níveis concentrações que variaram de 1 a 20 mg.L⁻¹. Para o NIP o procedimento foi realizado paralelamente da mesma forma. Os frascos foram submetidos a constante agitação por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 4000 rpm, o sobrenadante foi filtrado e então analisado no espectrofotômetro UV-VIS em 272 nm. O procedimento foi realizado em triplicata e os resultados da capacidade de adsorção (Q) foram calculados pela equação (1).

$$Q = \frac{(C_i - C_f) \times V}{m} \quad (1)$$

Q é a capacidade adsorviva de analito por massa de material (mg.g⁻¹), C_i e C_f são as concentrações iniciais e finais da solução (mg.L⁻¹), V é o volume de solução utilizado para o estudo (L), e m é a massa de MIP/NIP utilizada na adsorção, em gramas.

Para comparar o Q de MIP e NIP foi calculado também o fator de impressão (FI), a partir da equação (2):

$$FI = \frac{Q_{MIP}}{Q_{NIP}} \quad (2)$$

O fator de impressão FI é calculado a partir das capacidades adsorvivas de MIP e NIP, obtidas na equação anterior (1).

3.5. Estudos de otimização da fase sólida MISPE

3.5.1. Estudo de solventes de eluição por planejamento fatorial 2³

Para os estudos do MISPE, foram analisados alguns parâmetros. Primeiramente foi realizado um estudo de eluição baseado em planejamento fatorial, em que se variou três fatores: eluente, pH e volume de eluente. A estratégia

consistiu na utilização da triagem das variáveis que definiu o nível de variação -1 e +1 para cada um dos três fatores em estudo. As variáveis e seus respectivos níveis de variação serão mostrados na Tabela 1 e a matriz de planejamento codificada está descrita na Tabela 2.

Tabela 1: Parâmetros utilizados para os estudos de eluição utilizando o planejamento experimental do tipo 2³.

Fatores	Níveis de variação dos fatores	
	-1	+1
Eluente	MeOH/H ₂ O (50/50)	MeOH
pH	3	8
Volume de eluente	2mL	6mL

Tabela 2: Magnitudes codificadas utilizadas para os estudos de eluição com o planejamento experimental do tipo 2³.

Fatores		
Eluente	pH	Volume de eluente
-1	-1	-1
-1	-1	+1
-1	+1	-1
-1	+1	+1
+1	+1	+1
+1	-1	-1
+1	-1	+1
+1	+1	-1

Para a montagem do cartucho, um comercial já usado teve o seu material sólido retirado, em seguida o cartucho foi lavado consecutivas vezes, assim como os seus discos de filtração. Com o cartucho e os discos limpos e secos, foi inserido 200 mg de MIP, e um filtro de membrana de 22 µm para evitar a passagem de material.

Com o cartucho devidamente montado, iniciaram-se as análises dessa etapa. Foram utilizados 3 mL de metanol e 3 mL de água destilada na etapa de condicionamento, 10 mL de solução de cafeína 2 mg.L^{-1} na etapa de percolação da amostra, 1,5 mL de água destilada na etapa de lavagem. A análise do eluato foi conduzido em espectrofotômetro UV-VIS em 272 nm para averiguar se de fato ocorreu a retirada de cafeína do MISPE para o solvente de eluição. A vazão estabelecida foi de 0,5 mL/min com o auxílio de uma bomba peristáltica. Para avaliação de cada fator e sua interdependência com os demais, utilizou-se o software *Statistics*®. O sistema utilizado para o SPE é demonstrado pela Figura 4.



Figura 4: Instrumentação utilizada. Em (1) temos o suporte para o cartucho de SPE, em (2) temos a bomba peristáltica e em (3) temos a coleta do eluato que será analisado em HPLC ou em UV-VIS.

3.5.2. Estudo de comparação entre solventes de eluição

Para essa etapa, comparou-se dois solventes de eluição: metanol e acetonitrila, ambos em pH 3, acidificados com ácido clorídrico. O cartucho foi preenchido com 300 mg de MIP. A etapa de condicionamento foi estabelecida em 2 mL de metanol e 2 mL de água, de percolação da amostra em 5 mL de cafeína 1 mg.L^{-1} , lavagem com 1,0 mL de água destilada e eluição utilizando 2 mL de metanol pH 3 ou acetonitrila pH 3. A vazão ficou estabelecida em 0,5 mL/min. Nesta etapa o eluato foi recolhido em frascos específicos para a análise em um cromatógrafo com detector PDA e coluna C18 (4,6 x 250 mm, 5 μm). O método otimizado, para a

separação da cafeína, foi pela fase móvel metanol:água (45:55), vazão de 0,8 mL min⁻¹ e comprimento de onda de 272 nm. O procedimento foi realizado em triplicata. Para essa etapa, foi construída uma curva de calibração da cafeína nas concentrações de 0,1 mg.L⁻¹ a 10 mg.L⁻¹ obtidas por HPLC.

3.5.3. Estudo de pH da amostra

Afim de se avaliar o pH da amostra, foram preparadas 3 soluções de cafeína 1mg.L⁻¹, em pH 4, 7 e 9. O procedimento seguiu como no tópico 3.5.2, e o solvente de eluição utilizado foi o metanol pH 3. A solução da etapa de eluição foi recolhida para análise em HPLC. O procedimento também foi realizado em triplicata.

3.5.4. Estudo do volume *Breakthrough*

O volume *breakthrough* é um fator essencial para avaliar a capacidade de enriquecimento da fase sólida com a molécula alvo a baixos níveis de concentração. Para isso construiu um cartucho com 300 mg de MIP e passou-se 400 mL de cafeína a 0,1 mg.L⁻¹, coletou-se a cada 10 mL o líquido eluído afim de se saber se amostra percolou. O objetivo foi avaliar em que volume a fase sólida não seria capaz de reter a cafeína de forma eficiente, sendo visível em análises de HPLC. O procedimento com o condicionamento, lavagem e eluição foram os mesmos empregados do tópico 3.5.2.

3.5.5. Estudo de reutilização

Utilizando as mesmas condições do item 3.5.2, foi empregada uma amostra em pH 7, e metanol em pH 3 como solvente de eluição. O procedimento foi realizado sucessivas vezes até observar em HPLC a diminuição da concentração de cafeína no solvente de eluição.

3.5.6. Análise de custos

Para avaliar o custo envolvido na produção do MIP como fase sólida extratora em SPE, foram pesquisados os preços dos reagentes e solventes utilizados, bem como de alguns materiais. Dessa forma, o custo final da síntese do polímero foi comparado com o valor de mercado de uma fase sólida comercial.

4. Resultados e discussão

4.1. Caracterização morfológica e estrutural do MIP e NIP

O espectro obtido por análises de FT-IR para o MIP e NIP na Figura 5 não demonstrou diferenças significativas entre os dois polímeros, justificado pelo fato de ser o mesmo processo de síntese, exceto pela presença da MM. Dessa forma, os materiais não possuem diferenças estruturais ou químicas, apenas morfológicas, observadas na Figura 6. As bandas identificáveis na Figura 5 são: Em 3420 cm^{-1} , já indicado por Silva e Augusto (2006) se constitui no estiramento da ligação O-H referente a grupos silanóis não condensados e água residual. Em 2930 cm^{-1} , há o estiramento relacionado a ligação C-H. Em 1639 cm^{-1} um provável dobramento da ligação N-H, devido a presença de grupo amino no MF. Em 1070 cm^{-1} pode estar relacionado ao estiramento da ligação Si-OH. Em 470 cm^{-1} são referentes as ligações Si-O.

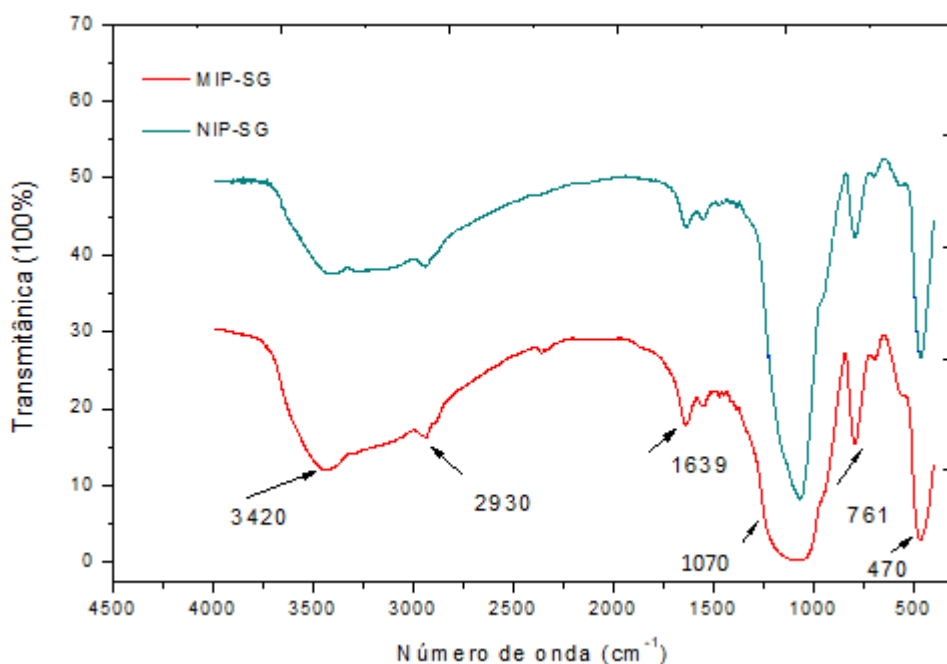


Figura 4: Espectro de absorção no infravermelho (FT-IR) em pastilha de KBr do MIP e NIP.

A caracterização morfológica do MIP/NIP foi obtida por microscopia eletrônica de varredura, e de uma forma qualitativa pôde-se observar algumas diferenças entre os dois materiais. Na Figura 6, observa-se em (A), (B), (C) o NIP enquanto que em

(D), (E), (F) ilustram fotomicrografias do MIP. Da esquerda para a direita, as imagens possuem aumento de 2000, 5000 e 10000 vezes. Nas imagens relacionadas ao MIP percebe-se uma maior porosidade, enquanto que em (C), para o NIP, observa-se uma superfície mais compactada e de baixa porosidade, justificado pela ausência da MM no seu processo de síntese.

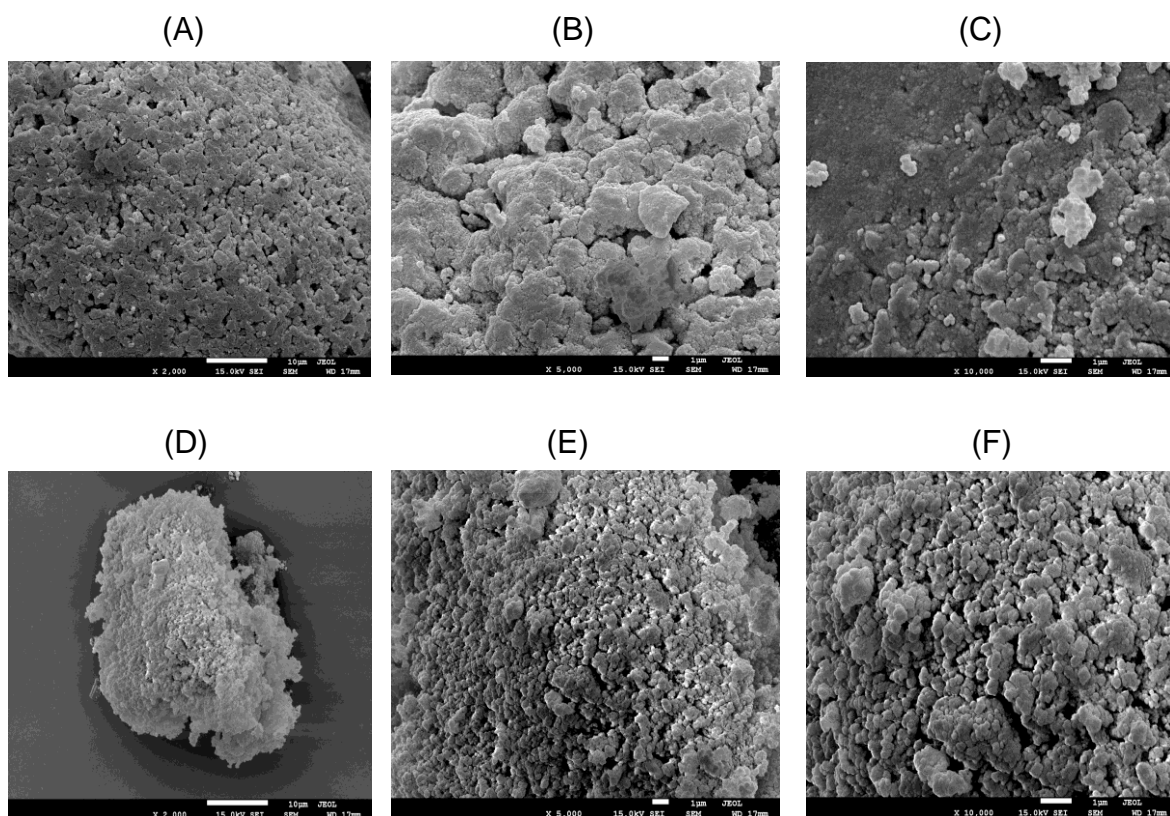


Figura 5: Imagens de microscopia eletrônica de varredura para o MIP e NIP. Em (A), (B), (C) são imagens obtidas pelo NIP, e (D), (E) e (F) são imagens do MIP. As Imagens tiveram um aumento de 2000, 5000 e 10000 vezes, respectivamente.

Para análises quantitativas do material foi investigado a sua área superficial específica, volume de poros e diâmetro médio dos poros. Utilizando o método BET para adsorção e dessorção de nitrogênio no material, os dados obtidos estão apresentados na Tabela 3. Pode ser observado que o MIP apresentou uma área específica 2x maior que o NIP, o que pode indicar para o material uma maior capacidade de sorção. Em relação ao tamanho médio dos poros observa-se que o MIP possui 3x mais que o NIP, fator que pode ter influência direta da presença da MM na sua síntese. Além disso, o MIP possui características de material mesoporoso de acordo com a IUPAC (Rouquerolt *et al.*, 1994), o que indica uma maior possibilidade de interações entre o analito e os sítios ativos do material, além

de dificultar o bloqueio dos poros. O MIP também apresenta um maior volume poros que o NIP, fato também observado no MEV. Isso significa mais sítios de interação disponíveis para o analito com a fase sólida. Dessa forma, os dados qualitativos obtidos pelo MEV estão em concordância com o ensaio de porosimetria.

Tabela 3: Porosimetria dos MIPs/NIPs sol-gel híbridos

	Área específica BET (m ² g ⁻¹)	Tamanho médio de poros (Å)	Volume de poros (cm ³ g ⁻¹)
MIP	130,720	57,825	0,452
NIP	67,326	20,955	0,169

No estudo termogravimétrico do MIP/NIP foi avaliado a estabilidade dos materiais quando submetidos a altas temperaturas. O resultado pode ser observado na Figura 7:

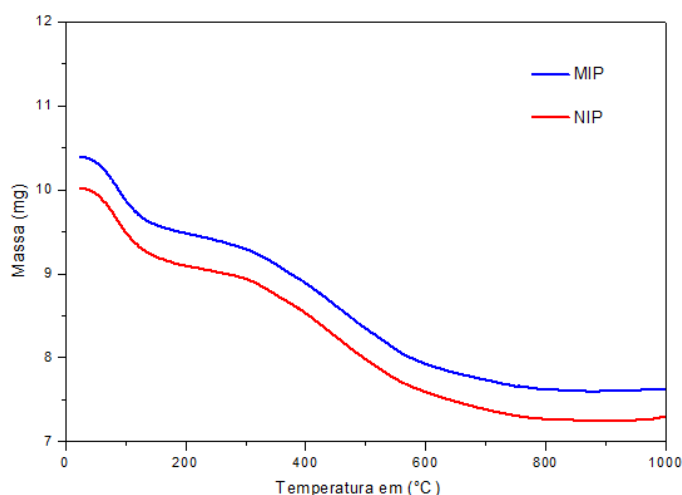


Figura 7: Gráfico termogravimétrico para o MIP e NIP.

A partir de 50 °C até 130 °C há a primeira perda de massa em ambos os materiais. Esse evento pode ser atribuído a perdas de compostos gerados na reação como água, etanol e metanol e que ainda estavam presentes na superfície dos materiais, assim como de reagentes que não foram consumidos no processo. A partir de 300 °C observa-se a segunda perda de massa, que é referente a perda de material orgânico e de grupos funcionais como o a hidroxila no material, que perdura até 700 °C. Dessa forma, o material se apresenta estável e possível de ser trabalhado em temperaturas e até 300 °C.

4.2. Estudos de cinética e equilíbrio de adsorção

Na avaliação para o tempo de equilíbrio de adsorção (Figura 8), foi obtido um tempo de 120 min para alcançar o equilíbrio. Para o NIP, esse tempo foi estimado em 60 minutos. A diferença entre os tempos pode ser explicada pela ausência de sítios de ligação específicos no NIP, demonstrado que a impressão durante a síntese é um fator crucial para o reconhecimento molecular e para a capacidade de religação do analito no material. Dessa forma, no NIP, há uma rápida saturação dos seus sítios de ligação, que não estão organizados em volta de uma cavidade. Além disso, a quantidade adsorvida pelo MIP foi maior do que para o NIP, devido a sua maior área superficial e um maior volume de poros, como foram observados nos ensaios de porosimetria.

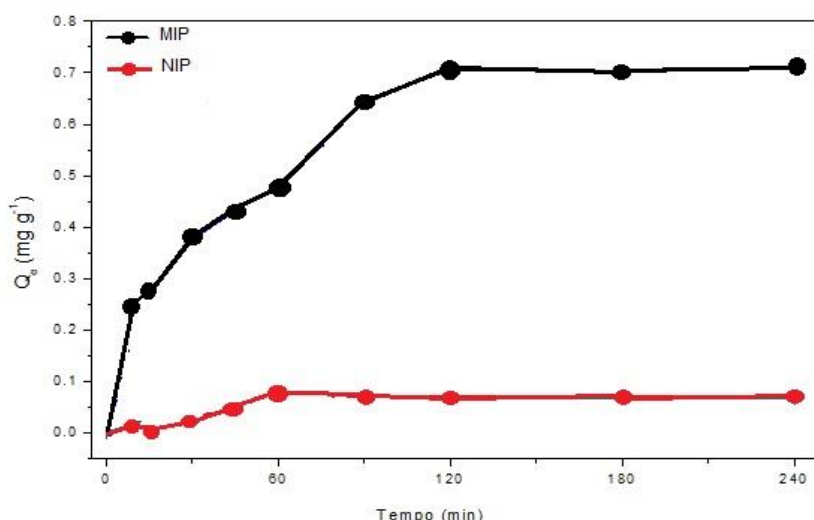


Figura 8: Gráfico sobre o estudo cinético para o MIP e NIP. Observa-se que a capacidade adsortiva se mantém constante ao alcançar o tempo de 120 minutos para o MIP.

Os estudos de isoterma de adsorção foram realizados para avaliar o reconhecimento molecular do MIP perante o polímero controle em função da concentração de cafeína. Na Figura 9 é possível observar que o MIP possui um Q evidentemente maior que o NIP. Com um valor de Q para o MIP igual a $0,91 \text{ mg.g}^{-1}$, observa-se também o aumento da capacidade adsortiva com o aumento gradual da concentração de cafeína na solução, estagnando em 10 mg.L^{-1} , onde os sítios de ligação já se encontram preenchidos. O valor de Q para o NIP foi de $0,08 \text{ mg.g}^{-1}$. Dessa forma o seu fator de impressão foi definido como 11,3.

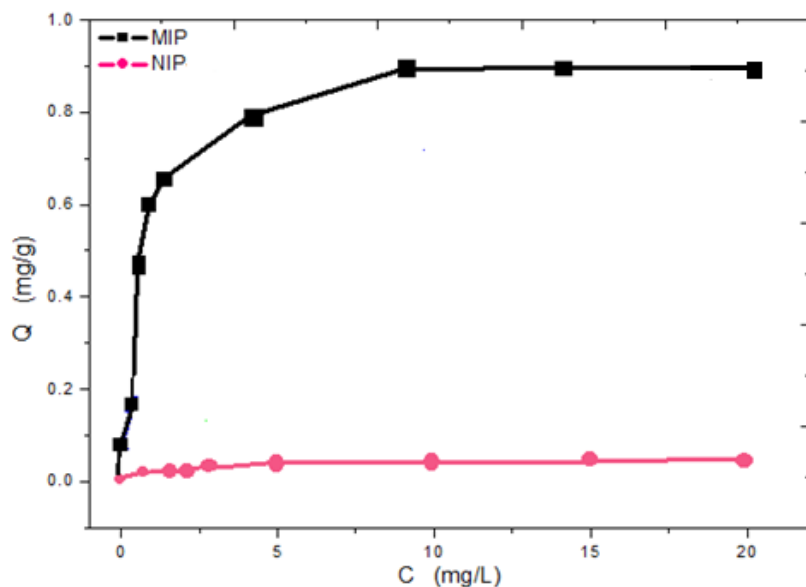


Figura 9: Isoterma de adsorção para o MIP e NIP. O MIP obteve um Q de $0,91 \text{ mg.g}^{-1}$, enquanto o NIP obteve um Q de $0,08 \text{ mg.g}^{-1}$, nos tempos de 10 minutos até 240 minutos.

4.3: Estudos de otimização da fase sólida MISPE

4.3.1: Estudo de pH

A avaliação do efeito do pH durante a etapa de percolação da amostra foi feita em meio ácido, básico e neutro. Considerou-se o pH 7 como o máximo de eficiência de extração, pois foi o meio em que a solução padrão de cafeína se encontrava. Foi comparado o pH 4 e pH 9 em relação a esse parâmetro. Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferenças significativas entre os valores de pH. Considerando pH 7 como 100% de recuperação do analito, em pH 4 obteve-se 99,98% de recuperação enquanto em pH 9 foi de 99,39%. Todos obtiveram uma ótima recuperação do analito, entretanto, o meio neutro foi escolhido para as análises, por ser o meio em que amostra já se encontrava. Uma justificativa que pode ser mencionada e que foi citada por Grassi (2008) é a provável competição de íons H^+ e OH^- com a cafeína nos sítios de ligação do polímero, o que diminuía então a interação do analito com o polímero nos pH 4 e pH 9, respectivamente.

Uma das etapas mais importantes para o SPE é a eluição, a qual foi avaliada de acordo com o item 3.5.1. A partir dos dados obtidos foi construído o seguinte gráfico de Pareto, observado na Figura 10:

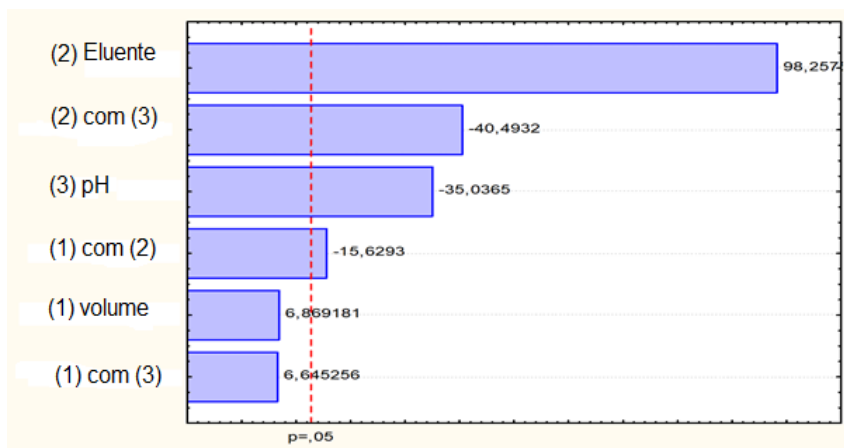


Figura 10: Gráfico de Pareto com os parâmetros escolhidos para a etapa de eluição.

O gráfico construído a partir do software *Statistics®* apresenta as variáveis com um nível de confiança a 95%. Correlacionando os fatores que foram pré determinados, obtém-se algumas informações, como o grau de relevância do tipo de eluente(2) a ser usado. Variando significativamente para o nível positivo, esse fator demonstra que o metanol é o mais relevante dos fatores envolvidos na eluição. A interação do metanol com o pH(3) também demonstra um valor significativo com grandeza negativa, isto é, o pH 3 mostrou-se mais relevante que o pH 8, fator revelado quando se observa apenas o fator pH sendo relevante para a grandeza negativa. Dessa forma, o fator pH se apresentou mais significativo que o fator volume(1), como é possível observar na interação de volume com tipo de eluente. A variável volume não obteve importância significativa a 95%, demonstrando que um volume de 2 mL ou 6 mL não são relevantes para o sucesso da extração. Dessa forma optou-se por um volume de 2 mL por possibilitar uma maior concentração do analito de interesse. Assim, estabeleceu-se que o metanol seria o eluente, a pH 3 e com volume de 2 mL. Com o procedimento já descrito das etapas anteriores do SPE no tópico 3.5, comparou-se a eficiência de eluição do MIP com NIP, e obteve-se para o MIP um índice de eluição de 99,45% enquanto do NIP de apenas 42,37%. Considerando que foi utilizado 10 mL da solução de cafeína a 2 mg.L⁻¹ como amostra e 2 mL de metanol em pH 3 como solução eluente, houve uma pré-concentração de 5 vezes da cafeína.

O que pode justificar uma melhor eficiência de dessorção em pH 3 que em pH 8 também pode ser a provável competição dos íons H⁺ presentes em maior concentração nessa faixa com a cafeína pelos sítios de ligação do MIP. Essa

“competição” faz com que a interação analito-polímero seja enfraquecida e então ser arrastada pelo solvente de eluição.

4.3.2: Estudo de comparação entre solventes de eluição

Com o intuito de utilizar um solvente alternativo que libere menos vapores tóxicos ao operador, comparou-se o metanol pH 3 com a acetonitrila pH 3 no procedimento descrito em 3.5.1. Foi obtido uma curva de calibração com soluções padrão de cafeína. Os valores obtidos são descritos na Figura 11:

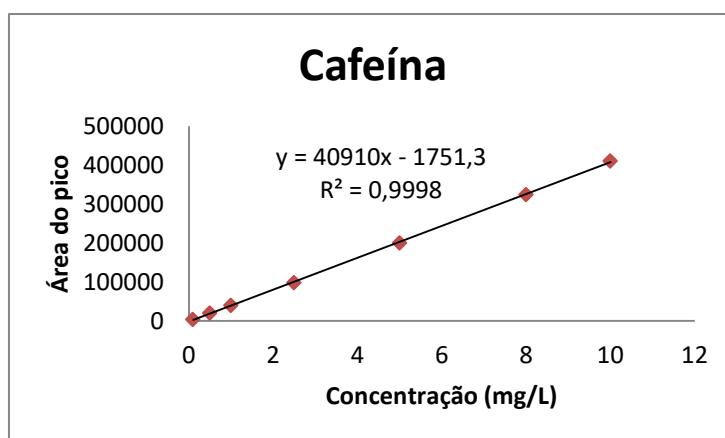


Figura 11: Curva de calibração da cafeína nas concentrações de 0,1mg.L⁻¹ a 10 mg.L⁻¹ obtidas por HPLC.

Como é observado na Tabela 4, a eficiência de dessorção com o metanol foi maior que a acetonitrila. Uma das razões que podem ser apontadas é capacidade do metanol fazer ligações de hidrogênio com a cafeína devido ao mesmo ser um solvente polar prótico. A acetonitrila, por sua vez, é um solvente polar aprótico, incapaz de fazer ligações de hidrogênio. A acetonitrila faz ligações do tipo dipolo, mais fracas que a de hidrogênio. Dessa forma, a cafeína preferencialmente será arrastada pelo metanol. Esse solvente entra em competição com as forças que regem entre a cafeína e a cavidade específica no MIP, que também são ligações de hidrogênio. No caso da acetonitrila, a sua força não é suficiente para arrastar e quebrar a ligação analito e fase sólida, fazendo com que a cafeína continue retida no MIP. Além disso, outros fatores já apontados por Silva (2009) como o parâmetro de solubilidade de Hildebrandt (δ) e a série eluotrópica segundo Snyder (ϵ^0) podem explicar os motivos do metanol ser um bom eluente. Ambos possuem valores semelhantes de δ (12,9 para o metanol e 11,7 para acetonitrila) e de ϵ^0 (0,95 para o

metanol e 0,65 para acetonitrila). Os dois parâmetros estão relacionados com a polaridade do solvente e seu poder de eluição. Quanto maior os valores desses parâmetros, maior a polaridade do solvente assim como é maior o seu poder de eluição. Dessa forma, com esses valores a eficiência de eluição foi observada experimentalmente pelo metanol.

Tabela 4: Valores obtidos de extração da cafeína para o metanol e acetonitrila.

Solvente	Replicata	mg/L	Média (mg/L)	Desvio padrão
Metanol	1	2,502	2,501	0,002
	2	2,499		
	3	2,502		
Acetonitrila	1	0,854	0,9	0,2
	2	0,825		
	3	1,153		

4.3.3. Estudo do volume *Breakthrough*

Ao passar o volume de 400 mL de cafeína a $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ pelo cartucho, os valores obtidos no HPLC demonstraram que o MISPE ainda possuía capacidade de adsorção de cafeína sem perder a eficiência de retenção. Isso significa que, os dados obtidos ao analisar o eluato coletado após a passagem da amostra ficaram bem abaixo da concentração de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, indicando que o material não perdeu a capacidade de adsorção mesmo utilizando grandes volumes.

4.3.4: Estudo de reutilização

O estudo de reutilização foi realizado visando comparar o custo de síntese do MIP proposto com os cartuchos comerciais. Os cartuchos comerciais possuem alto custo, não são reutilizáveis e ainda apresentam a massa de fase sólida fixa pela empresa. Com o procedimento descrito em 3.5.2, foram realizados 25 ciclos para o SPE. Observa-se que a extração foi bem sucedida, com variações de 98,6% até 103,5%. A partir do ciclo 25 observou-se a diminuição da concentração de cafeína presente no solvente de eluição, demonstrado que a partir desse ciclo houve a perda de grupos funcionais presentes na fase sólida e consequentemente diminuindo a

capacidade de reter o analito de interesse. Dessa forma, conseguiu-se um total de 24 reutilizações para um único cartucho de MISPE.

Tabela 5: Dados obtidos para a reutilização do cartucho.

Ciclo	5	10	15	20	25
MÉDIA (%)	98,99	102,36	102	103,52	98,6
DESVIO(%)	2,67	2,66	1,39	3,2	5,4

4.3.5: Análise de custos

Um das vantagens do MISPE em relação ao SPE tradicional é a especificidade do material diante de uma matriz complexa. Não obstante, é possível reutilizá-la a um bom nível de precisão em cada ciclo. Tendo isso em vista, comparou-se o preço de uma fase sólida comercial (C18) com o MIP sintetizado. A fase sólida comercial comparada foi o ácido 1-heptadecanocarboxílico, conhecido por C18, disponível no sítio da Sigma-Aldrich por R\$ 5714,00 reais para 100 g de produto. Supondo que cada cartucho possui 300 mg do material, o preço final da fase sólida comercial ficou em R\$17,14 reais. Os valores apresentados na Tabela 7 levam em consideração os reagentes utilizados para a síntese de um MIP. O rendimento da síntese após a retirada da molécula molde resultou em aproximadamente 1,2 g, a um custo final de R\$48,13 reais, o suficiente para construir quatro cartuchos MISPE com 300 mg de material. Contando com a quantidade de reutilizações, que foram 24, o preço final foi dividido por 28.

Tabela 6: Preços dos materiais utilizados com o valor total e posteriormente considerando as reutilizações e rendimento da síntese.

Material	Marca	Quantidade	Quantidade Usada	Custo	Preço Final
Cafeína 99%	Sigma-Aldrich	500g	0,776g	R\$ 391,00	R\$0,30
APTMS 97%	Sigma-Aldrich	100 mL	0,36mL	R\$ 348,00	R\$1,25
TEOS	Sigma-Aldrich	1L	1,8 mL	R\$ 713,00	R\$1,28
NH ₄ OH 23%	Biograde	1L	0,2mL	R\$ 36,00	R\$0,10
METANOL 99,8%	Biograde	1L	400mL	R\$ 113,00	R\$45,20
Total					R\$48,13
1 cartucho 300 mg MIP					R\$12,03
Reutilização+ Rendimento					R\$0,50

Vale salientar que se a fase sólida fosse usada apenas 1 vez, seu custo seria em torno de R\$ 12,00, ainda abaixo do valor de uma fase sólida comercial. Deve-se considerar ainda que há o custo do analista e da energia elétrica utilizada no processo. Os valores foram levantados em setembro de 2018.

5. Conclusão

Com os resultados obtidos da caracterização do material e sua aplicação, foi possível observar que o desenvolvimento de pesquisas em volta de MIP são cruciais para o avanço em pesquisas no que se refere à especificidade na detecção de pequenas concentrações dos analitos de interesse. Dessa forma, conclui-se que a síntese do polímero impresso molecularmente para a cafeína foi capaz de reconhecer molecularmente o analito de interesse, frente ao polímero não impresso. Além disso, a síntese sol-gel híbrido realizada em condições mais branda e pouco laboriosa permitiu que o processo seguisse de forma rápida e que a sua manipulação em laboratório fosse simplificada. A utilização de métodos termogravimétricos, ensaios de porosimetria, infravermelho e microscopia eletrônica de varredura foram adequados para estudar o material e observar diferenças significativas frente ao polímero controle.

Referente à sua aplicação em SPE observou-se que a fase sólida foi efetiva em reter a cafeína, bem como impediu a sua retirada na etapa de lavagem. A utilização de 2 mL na etapa de eluição foi o suficiente para retirar o analito, concentrá-lo e ser analisado em HPLC. A grande vantagem observada do MISPE frente as fases sólidas comerciais foi a reutilização do cartucho, mantendo um bom nível de precisão nas extrações com uma redução significativa no custo final do MIP. Além disso, o volume *Breakthrough* demonstrou a capacidade volumétrica do material para a determinada concentração, indicando que a fase sólida permite percolar grandes volumes de amostra e consequentemente aumentar o fator de pré-concentração.

Como perspectiva futura propõe-se avaliar a seletividade do material em amostras reais assim como em relação as moléculas análogas, como a teobromina e teofilina.

6. Referências

- Amparo, M. R. **Desenvolvimento e validação de métodos SPE-LC-MS e MEPS-LC-MS para a quantificação de fluoroquinolonas em matrizes aquosas.** Dissertação (Dissertação em Ciências) - USP, São Carlos, 2013.
- Andersson, L.; Sellergren, B.; Mosbach, K. **Imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers.** Tetrahedron Letters. 25(45), 5211-5214, 1984.
- Baggiani, C.; Giovannoli, C.; Anfossi, L.; Passini, C.; Baravalle, P.; & Giraudi, G. **A Connection between the binding properties of imprinted and nonimprinted polymers: A change of perspective in molecular imprinting.** Journal of the American Chemical Society, 134(3), 1513–1518, 2012.
- Borges, K.; Pereira, A.; Mano V.; **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos.** (ed.LTC) 2-8 (2015).
- Braga, L. R. **Polímero impresso molecularmente mediado por íons para extração em fase sólida de quercetina em amostras fitoterápicas.** Tese de Doutorado (Doutorado em Química) – UnB. Brasília(DF), 2013.
- Bueno, F. H. **Avaliação de parâmetros para a análise do teor de pesticidas em água utilizando a técnica SPME em Headspace para extração das amostras analisadas em GC-MS.** Trabalho de conclusão de curso (Química Industrial) - UFRGS, Porto Alegre, 2012.
- Canela, M. C., Jardim, W. F., Sodré, F. F., Grassi, M. T. **Caféina em águas de abastecimento público no Brasil.** São Carlos: Editora Cubo, 2014.
- Casarin, Fabiana. **Síntese e caracterização de Polímeros Molecularmente Impressos para determinação de caféina em águas superficiais.** Qualificação (Doutorado em Química) – UnB, Brasília, 2018.
- Collins, H., Braga, G. L. & Bonato, P. S. **Fundamentos de cromatografia.** (1997).
- Cheong, W. J., Yang, S. H. and Ali, F. **Molecular imprinted polymers for separation science: A review of reviews.** Journal of Separation Science, 36(3), 609–628, 2013.

Dourado, C. S. **Fotoderivatização e extração em fase sólida em linha para determinação de N-nitrosoglifosato em sistema de análises por injeção sequencial**. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química) – UnB, 2016.

Fernandes, Raquel M. T. **Polímeros de impressão molecular para extração seletiva de fármacos em matrizes biológicas e determinação por LC-MS/MS e MS/MS**. Tese de Doutorado (Doutorado em química) – UNICAMP, Campinas, 2012.

Figueiredo, E. C.; Dias, A. C. B.; Arruda, M. A. Z. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 364, 2008.

Fumes, B. H.; Silva, M. R.; Andrade, F. N.; Nazario, C. E. D.; Lanças, F. M. **Recent advances and future trends in new materials for sample preparation**. TrAC Trends in Analytical Chemistry. Volume 71, Pages 9-25, 2015.

Grassi, Viviane. **Polímeros molecularmente impressos (MIPs) como extratores em fase sólida em sistemas de análises em fluxo**. Tese de Doutorado (Doutorado em Química na Agricultura e Ambiente) – USP, Piracicaba. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 2008.

Hennion, M. **Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography**, Journal of Chromatography A, 856, 3–54, 1999.

Hiratsuka, R. S., Santilli, C. V., & Pulcinelli, S. H. **O processo sol-gel: Uma visão físico-química**. Química Nova, 18(2), 171-179, 1995.

JARDIM, I.C.S.F. **Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas**. Scientia Chromatographica, 2(1), 13-25, 2010.

Laaks, J., Jochmann, M. A., Schmidt, T. C. **Solvent-free microextraction techniques in gas chromatography**. Analytical and Bioanalytical Chemistry 402 565–571, 2012.

Leitão, G. S. **Desenvolvimento de um polímero impresso molecularmente para análise de galaxolide em matrizes ambientais.** Dissertação de Mestrado(Dissertação em Engenharia do Ambiente) - Universidade do Porto, Porto (2014).

Marestoni, L. D. *et al.* **Polímeros impressos com íons: Fundamentos, estratégias de preparo e aplicações em Química Analítica.** Química Nova. 36(8), 1194–1207, 2013.

Mata, K. **Preparo e aplicação de poliacrilamida molecularmente impressa como adsorvente de glifosato e AMPA.** Trabalho de conclusão de curso (Química) - Unesp, São José do Rio Preto, 2014.

Oliveira, E. C. **Aplicação da extração em fase sólida na pré-concentração de compostos fenólicos clorados em efluentes de branqueamento de celulose.** Dissertação de mestrado(Dissertação em Química) – UFRGS, 1999.

Pauling, L. **A theory of the structure and process of formation of antibodies.** J. American Chemical Society, 62(6), 2643–2657, 1940.

Pichon, V., Delaunay-Bertoncini, N., & Hennion, M. C. **Chapter 33: Immunosorbents in sample preparation.** Comprehensive Analytical Chemistry, 1081–1100, 2002.

Queiroz, S. C., Collins, C. H., e Jardim, I. C. **Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica.** Química Nova, 24(1), 68-76, 2001.

Rossi, D.T.; Miller, K.G. **Sample preparation methods for the analysis of pharmaceutical materials.** Separation Science and Technology, 5, 165-201, 2004.

Rouquerolt, J. *et al.* **Recommendations for the characterization of porous solids.** Pure & Applied Chemistry, 66(8), 1739–1758, 1994.

Shea, K. J. *et al.* **Template Synthesis of Macromolecules. Synthesis and Chemistry of Functionalized Macroporous Polydivinylbenzene.** Journal of the American Chemical Society, 102(9), 3149–3155, 1980.

Silva, R. G. **Materiais sorventes impressos molecularmente preparados por processos sol-gel**. Tese de doutorado (Doutorado em Química) - Unicamp, Campinas, 2009.

Silva, R. G., Augusto, F. **Sol-gel molecular imprinted ormosil for solid-extraction of methylxanthines**. Journal of chromatography A, 216-223, 2006.

Soares, A. L. N. **Extração em fase sólida utilizando polímeros de impressão molecular para determinação de estrógenos em cursos d'água**. Trabalho de conclusão de curso (Química) - UFABC, Santo André (2015).

Tamayo, F. G., Turriel, E., Esteban, A. M. **Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends**. Journal of Chromatography A. 1152, 32–40(2007).

Vaz, N. M. **Uma (não tão) breve história da imunologia cognitiva: mecanismos de geração e manutenção da diversidade do repertório imune**. Revista de Neurociências, 5(4), 196, 2009.

Won Jo Cheong. Song Hee Yang, Faiz Ali. **Molecular imprinted polymers for separation science: A review of reviews**. Journal of Separation Science. 36, 609–628, 2013.

Yang, C., Wang, J., Li, D. **Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: A review**. Analytica Chimica Acta, 799, 8– 22, 2013.